

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 2004/003848

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

22. 3. 2004

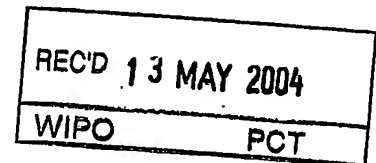
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   3 月 3 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 0 9 6 0 0 2  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 0 9 6 0 0 2 ]

出 願 人      独立行政法人 科学技術振興機構  
Applicant(s):

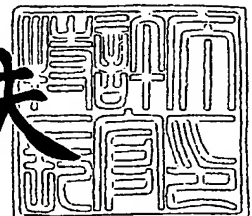


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   4 月 2 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 4 8 3 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y2002-P477

【提出日】 平成15年 3月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/08

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎北御所町 2 5 - 5 0 1

    【氏名】 高橋 政代

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原中町 6 - 4 - 1 9

    【氏名】 笹井 芳樹

【発明者】

    【住所又は居所】 石川県金沢市東山 3 - 1 2 - 1 1

    【氏名】 河崎 洋志

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市上京区中立売通堀川西入役人町 2 6 0 - 1  
2 0 2 号

    【氏名】 大音 壮太郎

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

    【識別番号】 100080034

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 原 謙三

    【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 003229

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 水晶体細胞の作製方法、およびこの方法によって得られる水晶体細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を  $2 \sim 50$  (ng/ml) の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、

上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨細胞 PA6 上に  $2 \sim 6.5$  (コロニー/cm<sup>2</sup>) の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とする水晶体細胞の作製方法。

【請求項 2】

上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、維持された上記 ES 細胞を、ES 分化培地を用いて 1 回洗浄する洗浄工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 記載の水晶体細胞の作製方法。

【請求項 3】

上記 ES 細胞は、霊長類由来のものであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の水晶体細胞の作製方法。

【請求項 4】

上記 ES 細胞は、カンクイザル由来のものであることを特徴とする請求項 3 記載の水晶体細胞の作製方法。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞の作製方法によって得られる水晶体細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、白内障などの眼疾患の治療に応用でき、胚性幹細胞 (ES) 細胞から水晶体細胞への分化を誘導することで水晶体細胞を作製する新規の方法、およ

び、この作製方法によって得られる水晶体細胞に関するものである。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

白内障は、種々の原因で水晶体に混濁を生ずる疾患であり、水晶体の混濁によって視力低下を引き起こす重大な眼疾患である。現在の白内障の治療法としては、混濁した水晶体を水晶体嚢内から切除し、後嚢上に人工の眼内レンズを固定するという手術によるものが一般的である。この治療法に用いられる眼内レンズは、眼球の切開を小さくするためによりソフトなものへと改良が進められている。

#### 【0003】

しかしながら、この人工の眼内レンズでは、レンズ厚の調節は行えず本来生体の水晶体が有するような調節力を再現することができないのが現状である。そのため、眼内レンズを移植するという白内障手術では、水晶体の弾力性が低下して近くを見るとき焦点を合わせる調節機能が低下した状態である、所謂老眼（老視）状態を改善することはできない。また、若年者の白内障では、手術により一挙に老視化するために手術に踏み切れない例も多く存在する。

#### 【0004】

そこで、近年注目されている組織培養技術を利用してヒトの水晶体細胞を培養し、移植用の生体材料として使用すれば、上述の問題点が解決できると考えられるため、昨今盛んに研究が行われている。その一例として、特許文献1には、ヒト水晶体上皮細胞にハイブリッドアデノウィルスSV40を感染させることによって、また、特許文献2にはヒト水晶体上皮細胞に不死化遺伝子（SV40のラージT抗原をコードする遺伝子）を導入することによって、不死化したヒト水晶体上皮細胞を作製する方法が記載されている。

#### 【0005】

しかしながら、この特許文献1および2のように、細胞を不死化するということは、細胞が常に腫瘍化するという危険性もはらんでいる。また、アデノウィルス感染では、炎症を引き起こすという危険性も有している。

#### 【0006】

##### 【特許文献1】

米国特許第5,643,782号明細書

【0 0 0 7】

【特許文献2】

米国特許第5,885,832号明細書

【0 0 0 8】

【特許文献3】

米国特許第5,843,780号明細書

【0 0 0 9】

【特許文献4】

米国特許第6,200,806号明細書

【0 0 1 0】

【非特許文献1】

Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S. et. al., Induction of midbrain dopaminergic from ES cells by stromal cell-derived inducing activity, Neuron, 2000年、28巻、31-40頁

【0 0 1 1】

【非特許文献2】

Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K. et. al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity, Proc Natl Acad Sci USA, 2002年、99巻、1580-1585頁

【0 0 1 2】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、生体材料として水晶体細胞を培養する技術に関する研究は盛んに行われているものの、今のところ、実際に生体材料として使用できるヒト水晶体細胞を作り出す方法は確立されていないのが現状である。

【0 0 1 3】

ところで、最近、霊長類やヒトにおいて胚性幹細胞（ES細胞）が単離され、これからの医療として再生医学が注目されている（特許文献3、4参照）。この

再生医学を利用することによって、ES細胞から水晶体細胞への誘導方法が確立できれば、水晶体細胞を嚢内へ注入することによって、調節力を持ったレンズを再生できる可能性があり、白内障と同時に老眼の治療も可能となる。また、このようなES細胞由来の水晶体細胞は、上述の特許文献1および2のような細胞操作を行うものではなく、より本来の水晶体細胞に近いものであるため、生体材料への応用の可能性も高い。

#### 【0014】

非特許文献1、2には、ES細胞への分化誘導法としてSDIA法を用いて、神経細胞や網膜色素上皮細胞を産生することができると報告されている。しかしながら、上記文献に記載の方法では、均質な細胞群を再生することはできない。

#### 【0015】

このように、これまでのところ、実用に供する目的で、霊長類での水晶体の再生に成功した例はなく、その生産方法の確立が待たれている。そこで本発明は、ES細胞に分化を誘導することで水晶体細胞を安定して作製する方法、および、この方法によって作製される水晶体細胞を提供する。

#### 【0016】

##### 【課題を解決するための手段】

本願発明者等は、上記の問題点について鋭意検討した結果、上記非特許文献1、2に記載のSDIA (Stromal-cell-Derived Inducing Activity) 法を応用し、そのES細胞維持条件や分化誘導条件を様々に変更することによって、水晶体細胞を安定して生産できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0017】

すなわち、本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子FGF-2を2～50 ng/mlの濃度で含有する培地を用いてES細胞を維持するES細胞維持工程と、上記ES細胞維持工程の後に、上記ES細胞をマウス頭蓋骨細胞PA6上に2～6.5コロニー/cm<sup>2</sup>の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記ES細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とするものである。

#### 【0018】

上記の方法によれば、ES細胞から水晶体細胞を安定して作製することができ、移植用生体材料としての利用可能性を有する水晶体細胞およびその水晶体細胞からなる水晶体線維組織を得ることができる。なお、この水晶体細胞およびその組織は、本明細書ではレントイドとも呼ぶ。上記の方法で作製された水晶体細胞およびその組織（レントイド）を移植用の生体材料として用いれば、従来の白内障の治療などに用いられる人工の眼内レンズとは異なって、本来の生体が有する水晶体厚の調節力と同様の調節力を有することができる。

#### 【0019】

さらに、上記の方法によって作製されるES細胞由来の水晶体細胞は、上述の特許文献1および2のような細胞操作を行うものではなく、より本来の水晶体細胞に近いものであるため、生体材料への応用の可能性も高い。また、上記の方法によって得られた水晶体細胞は、ES細胞を利用した分化誘導に関する種々のメカニズムの解明に繋がるとともに、再生医療の発展に貢献することが期待され、非常に有用である。

#### 【0020】

また、本発明の水晶体細胞の作製方法は、上述の工程に加えて、上記ES細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、維持された上記ES細胞を、ES分化培地を用いて1回洗浄する洗浄工程をさらに含むことが好ましい。

#### 【0021】

上記の方法によれば、ES細胞からの水晶体細胞への分化誘導をより良好に引き起こさせ、水晶体細胞を均質な細胞群として得ることができる。それゆえ、上記の方法によって得られた水晶体細胞は、生体材料としての利用可能性を有し、再生医療の発展に貢献することができる。

#### 【0022】

また、本発明の水晶体細胞の作製方法において、上記ES細胞は霊長類由来のものであることが好ましい。

#### 【0023】

上記の方法によれば、ヒトも霊長類に属するため、よりヒトの水晶体に近い水晶体細胞を容易かつ豊富に作製することができる。そのため、上記の方法によっ



て作製された水晶体細胞は、ヒトにおける種々の眼疾患の治療薬の研究開発に有用である。なお、本発明の水晶体細胞の作製方法は、ヒトを含む霊長類のES細胞から水晶体細胞への分化誘導を成功させた初めての方法である。

#### 【0024】

なお、上記霊長類として具体的には、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、カニクイザルなどが挙げられる。後述の実施例においては、カニクイザルのES細胞について、本発明の方法を用いて水晶体細胞が実際に分化誘導されており、霊長類の生体における水晶体の分化過程と同じような分化過程をたどることが確認されている。そのため、本発明の水晶体方法の作製方法は、カニクイザル由来のものであることがより好ましい。

#### 【0025】

また、本発明の水晶体細胞は、上述の方法によって作製されたものである。

#### 【0026】

上記の水晶体細胞は、ES細胞から均質な細胞群として再生されたものであるため、再生医療における移植用の生体材料の開発に有効利用することができる。本発明の水晶体の利用方法として具体的には、該水晶体細胞を水晶体嚢内に注入し、水晶体厚の調節が可能なソフトな水晶体を再生するという方法が考えられる。この方法は、白内障の治療に有用であるとともに、白内障と老眼を同時に治療できるという利点も有している。

#### 【0027】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明についてより具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

#### 【0028】

本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子FGF-2を2～50 ng/mlの濃度で含有する培地を用いてES細胞を維持するES細胞維持工程と、上記ES細胞維持工程の後に、上記ES細胞をマウス頭蓋骨細胞PA6上に2～6.5コロニー/cm<sup>2</sup>の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記ES細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなること

を特徴とするものである。

#### 【0029】

この水晶体細胞の作製方法は、ES細胞を利用した分化誘導において、フィーダー細胞としてマウス頭蓋骨髓細胞PA6を用いるSDIA法を利用したものであり、特にヒトなどを含む霊長類のES細胞に対して適用することができる。そして、本発明の水晶体細胞の作製方法は、特に以下の3つの点に特徴を有している。

(1) 未分化状態のES細胞の維持に使用する培地に添加するFGF-2の最終濃度

(2) ES細胞をPA6に植え付けるときの細胞密度

(3) ES細胞をPA6に植え付ける前に実施されるES細胞の洗浄の回数

ここで、上記3つの特徴点について順に説明する。まず、(1)の未分化状態のES細胞の維持に使用する培地に添加するFGF-2の最終濃度について説明する。

#### 【0030】

本発明の水晶体細胞の作製方法においては、上記ES細胞維持工程において、線維芽細胞増殖因子FGF-2を2～50 ng/mlの濃度で含む培地を用いてES細胞を維持する。ここでES細胞を維持するとは、ES細胞を未分化状態のまま維持することを意味し、このES細胞維持工程には、適宜ES細胞を継代することも含まれる。また、上記培地には、細胞を培養・維持することが可能な種々の培地が含まれるものとする。

#### 【0031】

そして、上記ES細胞維持工程においては、培地中の線維芽細胞増殖因子FGF-2の最終濃度を2 ng/ml以上とすることで、後述の実施例にも示されるようにレントイドの分化を誘導することができる。また、上記ES細胞維持工程において、FGF-2の培地中の最終濃度が高くなり過ぎると、細胞増殖が強くなり維持が困難になるという弊害が発生するため、本発明では、FGF-2の最終濃度は50 ng/ml以下とする。

#### 【0032】

また、後述の実施例には、FGF-2の濃度が2 ng/mlの場合よりも4 ng/mlの場合の方が、レントイドの分化誘導がより促進され、さらに、4 ng/mlの場合よりも8 ng/mlの場合の方が、レントイドの分化誘導がより一層促進されること示されている。それゆえ、ES細胞維持工程における線維芽細胞増殖因子FGF-2の維持培地中の濃度は、4～50 ng/mlであることが好ましく、より良好な分化を誘導するためには、8～32 ng/mlであることがさらに好ましい。

#### 【0033】

ES細胞の維持工程におけるFGF-2の濃度条件以外の各条件については、従来公知の方法に従って行えばよい。この維持方法の具体的な例としては、実施例に記載の方法を挙げることができる。

#### 【0034】

続いて、本発明の第2の特徴点である(2)のES細胞をPA6に植え付けるときの細胞密度について説明する。

#### 【0035】

通常、SDIA法によるES細胞の分化誘導においては、ES細胞の維持工程の後に、フィーダー細胞としてマウス頭蓋骨髓細胞PA6を用いてES細胞を植え付け、分化の誘導を行う。本発明の水晶体細胞の作製方法においては、この分化誘導工程において、未分化状態が維持されたES細胞の細胞密度を2～6.5 (コロニー/cm<sup>2</sup>)として、フィーダー細胞PA6への植え付けを行う。なお、この細胞密度2～6.5 (コロニー/cm<sup>2</sup>)とは、PA6細胞を保有する内径10 cmの培養皿1枚におけるコロニー数に換算すると、約150～500コロニーとなる。すなわち、本発明の水晶体細胞の作成方法では、分化誘導工程におけるPA6細胞へのES細胞植え付け時の細胞密度を、150～500 (コロニー/内径10 cmの培養皿)とすると言い換えることもできる。

#### 【0036】

上記のように、PA6への植え付け時のES細胞密度を2 (コロニー/cm<sup>2</sup>)以上とすることで、後述の実施例にも示されるように、特に霊長類などのES細胞から、水晶体細胞を分化誘導することができる。また、上記ES細胞密度が

高くなり過ぎると、FGF-2の濃度の場合と同様に細胞の維持が困難になるという弊害が発生するため、本発明では、上記ES細胞密度の上限は6.5（コロニー／cm<sup>2</sup>）以下とする。

#### 【0037】

また、本発明の水晶体細胞の作製方法における、PA6細胞上へのES細胞植え付け時の細胞密度は、2.5～4.0（コロニー／cm<sup>2</sup>）とすることがより好ましい。この細胞密度2.5～4.0（コロニー／cm<sup>2</sup>）とは、PA6細胞を保有する内径10cmの培養皿1枚におけるコロニー数に換算すると、約200～300コロニーとなる。すなわち、本発明の水晶体細胞の作成方法では、分化誘導工程におけるPA6細胞へのES細胞植え付け時の細胞密度を、200～300（コロニー／内径10cmの培養皿）とすることが好ましい、と言い換えることもできる。なお、この細胞密度200～300（コロニー／内径10cmの培養皿）という値は、神経誘導時における細胞密度の約1.5～2倍である。上記の細胞密度で植え付けを行うことによって、均質な水晶体細胞群をより安定して得ることができる。

#### 【0038】

なお、本発明の水晶体細胞の作製方法における分化誘導工程において、ES細胞をPA6上に植え付けた後の培養条件については、従来公知のES細胞における分化誘導時の培養条件に従えばよい。具体的には、培養温度は34～38℃が好ましく、培養pHはpH6.0～8.0が好ましい。また、培養系については、静置培養、回転培養、浸透培養等を適宜選択することができる。

#### 【0039】

続いて、本発明のもう一つの特徴点である（3）のES細胞をPA6に植え付ける前に実施されるES細胞の洗浄の回数について説明する。

#### 【0040】

このES細胞の洗浄については、本発明の水晶体細胞の作製方法において、ES細胞維持工程と分化誘導工程との間に実施される。そして、本発明では、ES細胞維持工程において未分化状態が維持されたES細胞を、ES分化培地を用いて1回のみ洗浄し、維持培地を洗い流すことが好ましい。

## 【0041】

従来のSDIA法における未分化ES細胞の洗浄では、その回数は3回であったが、本発明では、この洗浄回数を3回から1回にすることによって、ES細胞からの水晶体細胞への分化誘導をより良好に引き起こさせ、水晶体細胞を均質な細胞群として得ることができる。

## 【0042】

上記ES細胞の洗浄工程に用いられるES分化培地としては、分化誘導時に用いる分化誘導培地と同じものを使用することが好ましい。そして、使用される上記ES分化培地の量は、未分化ES細胞ペレットの体積の30～100倍であることが好ましい。

## 【0043】

上述の水晶体細胞の作製方法によって、ES細胞から水晶体細胞の分化誘導を行えば、PA6細胞上での2～3週間の培養によって、水晶体細胞およびその組織（レントイド）を安定して得ることができる。

## 【0044】

なお、後述の実施例においても示されるように、ES細胞維持培地におけるFGF-2の濃度、および、植え付け時のES細胞の細胞密度をともに増加させれば、分化の誘導は相乗的に高まる。それゆえ、上記FGF-2の濃度および上記ES細胞の細胞密度を、上述の範囲内でともに高くすれば、より良質な水晶体細胞を安定して作製することができる。

## 【0045】

本発明の水晶体細胞の作製方法は、ヒトを含む霊長類のES細胞において実施されることが好ましい。本発明を霊長類のES細胞に適用すれば、ヒトの水晶体に近い水晶体細胞を容易かつ豊富に作製することができるため、ヒトにおける種々の眼疾患の治療薬の研究開発に有用である。

## 【0046】

また、本発明の水晶体細胞は、本発明の水晶体細胞の作製方法によって作製されたものであり、本発明の範囲内で条件を適宜変更させて作製された種々の水晶体細胞が含まれる。

## 【0047】

本発明の水晶体細胞は、ES細胞の分化に関するメカニズムを解明や、白内障治療薬の研究開発に有用であるとともに、人工の眼内レンズよりもレンズ厚の調節に優れた眼内レンズとして使用できる可能性を有している。

## 【0048】

## 【実施例】

以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。本実施例では、霊長類のES細胞の一例として、カニクイザル (Cynomolgus Monkey) のES細胞を用いて水晶体細胞の分化誘導が実施された。

## 【0049】

## 〔1〕実験方法

本実施例は、以下の(1)から(4)に記載の方法で行われた。

## 【0050】

## (1) ES細胞の維持

まず、本実験に用いられるカニクイザルのES細胞の入手方法について説明する。

## 【0051】

ES細胞系は、従来文献 [Suemori H., Tada T., Torii R. et. al., Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI, Dev Dyn., 2002年、222巻、273-279頁] に記載に基づいて、カニクイザルの胚盤胞から得られた。そして、その多能性が確認された。

## 【0052】

未分化のES細胞は、マイトマイシンCによって不活性化されたマウス胚性幹線維芽 (STO細胞) のフィーダー層上に保持された。細胞は0.1mM 2-メルカプトエタノール (シグマ製)、1000U/ml 白血病抑制因子 (ESGRO、ケミコン製)、20% ノックアウト血清代替物 (ギブコ製)、0.1mM 非必須アミノ酸 (ギブコ製)、8ng/ml 線維芽細胞増殖因子 (FGF-2、アップステート製) が補われたDMEM/F-12培地 (シグマ製) で培養された。培地は毎日交換された。

## 【0053】

その後、ES細胞の継代は、0.25%トリプシンを含む1mM  $\text{CaCl}_2$  PBS溶液、20% ノックアウト血清代替物で処理された。そして、マウス頭蓋骨髓由来のPA6上に植え付ける3～4日前から、線維芽細胞増殖因子FGF-2が濃度2、4、8 ng/mlでそれぞれ添加された。

## 【0054】

## (2) レントイドの誘導

続いて、FGF-2を各濃度で含有する培地上で維持されたES細胞について、以下のような手順で分化の誘導が実施された。

## 【0055】

PA6はフィーダー細胞層として使用するために、ゼラチンコートされた培養皿に植え付けられた。トリプシン処理に続いて、部分的に分離されたES細胞群(30～50個/1群)は、ゼラチンでコートされた10% FBS (ハイクローン製)を含むGMEM培地(ギブコ製)上に播かれた。37℃で30分間のインキュベートの後、ES細胞はピペッティングによって分散された。遠心分離によって集められた細胞ペレットは、ES分化培地[10% ノックアウト血清代替物、1mM ピルビン酸(シグマ製)、0.1mM 非必須アミノ酸、0.1mM 2-メルカプトエタノール(和光製)]とともに洗浄された。

## 【0056】

その後、洗浄されたES細胞は、PA6フィーダー細胞層上に植え付けられ、分化の誘導が試みられた。なお、この植え付け工程では、PA6細胞上に植え付けられるES細胞の細胞密度が、高密度(200コロニー以上/内径10cmの培養皿)のものと、低密度(150コロニー以下/内径10cm培養皿)のものの2種類が作製された。植え付けられたES細胞は、分化培地で少なくとも6週間培養された。培地は3日間ごとに交換された。

## 【0057】

## (3) 培養細胞の免疫組織化学的調査

上記(2)の方法で培養された細胞について、免疫組織化学的な調査が実施された。

## 【0058】

細胞は4% パラホルムアルデヒド（和光製）中で1時間保持され、その後2.5% スクロースPBS中に浸された。0.1M リン酸バッファー（PB）で洗浄された後、試料は0.005% サポニン（0.1MPB-saponin、メルク製）を含む0.1M PB中で20% 脱脂粉乳とともに1時間インキュベートされ、非特異的な抗体結合をブロックした。5% 脱脂粉乳を含む0.1M PB-saponinで希釈された一次抗体とともに、試料は4℃で24時間インキュベートされた。ウサギのポリクローナル抗クリスタリンアルファA（1:1000、ストレスジェン製）が一次抗体として使用された。この抗体の活性は、ポジティブコントロールとしてラットのレンズを使用して確認された。0.1M PBでの洗浄後に、試料は、5% 脱脂粉乳を含む0.1M PB-saponinで希釈されたフルオレセイン共役ロバ抗ウサギ免疫グロブリン（1:100、アマシヤム製）二次抗体とともに室温で1時間インキュベートされた。0.1M PBで洗浄した後、試料はグリセロールPBS（1:1）とともにスライドに固定され、レーザー自動読み取り共焦点顕微鏡（ライカ製）で観察された。

## 【0059】

（4）SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット解析  
上記（2）の方法で培養された細胞について、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット解析が実施された。

## 【0060】

細胞はスクラッピングによって集められ、5mM 2-メルカプトエタノール（和光製）を含む500 $\mu$ lの溶解バッファー（レムリサンプルバッファー、バイオラッド製）中に溶解された。細胞懸濁液は氷上で均質化された。均質化された細胞は-80℃で保存された。ES細胞溶解物は電気泳動にかけられ、分離されたタンパク質は、PVDF膜（Immobilom-P、ミリポア製）に転写された。非特異的な抗体結合は、20%脱脂粉乳を含む0.1MPBとの1時間のインキュベーションによってブロックされた。ブロットは5%脱脂粉乳を含む0.1M PBで希釈された一次抗体とともに室温でインキュベートされた。ウサギのポリクローナル抗体、抗クリスタリンアルファA（1:1000、ストレスジェン製）



および、抗 Pax 6 (1:200、サンタクルーズ製) が、一次抗体として使用された。一次抗体結合は、ABC法に基づいてアルカリフォスファターゼ (1:100、ヴェクター製) と結合した抗ウサギ IgG を使用して検出された。0.1MPB で洗浄された後、プロットはプロトコルに従ってフォスファターゼ基質 (コニカ免疫染色、コニカ製) とともに現像された。

#### 【0061】

##### 〔2〕 結果

続いて、上記の方法で行った本実験の実験結果を以下の (1) から (4) に示す。

#### 【0062】

##### (1) レントイドの誘導について

PA6細胞上での2～3週間の培養によって、ES細胞コロニー全体が色素沈着を引き起こすことなく成長し続ける分化細胞が作製された。これらの細胞を位相差顕微鏡によって観察した結果を図1(a)から(d)に示す。図1(a)は、誘導開始から30日後の比較的小さな細胞であり、図1(b)は、誘導開始から53日後の大きな細胞を観察した結果である。図1(a)および(b)に示すように、培養された細胞は、最終的に蓄積して大きさを変化させる透明体を形成した。なお、各図の右下に示すバーによって、その大きさがわかる。

#### 【0063】

図2には、分化誘導された細胞について、免疫染色を行った結果を示す。図2において白く示される部分が、免疫染色によって染色された部分である。この結果から、分化誘導された細胞が抗クリスタリンアルファA抗体を有していることが確認され、分化誘導された細胞がクリスタリンアルファAを発現していることが分かった。これによって、分化誘導された細胞はレントイドとして特徴付けられた。

#### 【0064】

また、いくつかのコロニーが、網膜色素性上皮細胞を形成することが確認された(図1(c)参照)。網膜色素性上皮細胞のほとんどが、レントイドを含むコロニーから独立したコロニーにおいて発生した。実際の眼で確認されるのと同じ

形状で、レントイドと網膜色素性上皮細胞とが一つのコロニー内に存在するものも見られた(図1(d)参照)。

#### 【0065】

なお、このレントイドは、誘導開始から14～16日後に初めて確認された。レントイドを含むコロニーの比率は、誘導開始から20日後から次第に増加した。レントイドの数は、誘導開始から40日以内にピークに達した。

#### 【0066】

##### (2) ウエスタンブロッティングによる解析結果

レントイドによるクリスタリンアルファAの発現が、ウエスタンブロット解析によってさらに調査された。具体的には、分化誘導から40日後のレントイドのタンパク質がPVD F膜に転写された後、電気泳動が行われ、抗クリスタリンアルファA抗体あるいは抗Pax6抗体の探査が行われた。

#### 【0067】

その結果を図3に示す。図3(a)は、クリスタリンアルファAの発現を調査したウエスタンブロット解析結果であり、レーン1はポジティブコントロール(ラットの水晶体タンパク質)、レーン2はネガティブコントロール(ラットの神経幹細胞)、レーン3はSDIA法によるレントイドタンパク質の全量である。図3(b)は、Pax6の発現を調査したウエスタンブロット解析結果であり、レーン1はPA6細胞のタンパク質、レーン2は未分化のES細胞の全量タンパク質、レーン3はSDIA法によるレントイド細胞の全量タンパク質である。

#### 【0068】

図3(a)に示すように、ウサギ抗クリスタリンアルファAポリクローナル抗体は、22kDaのタンパク質を検知した。クリスタリンアルファタンパク質を示すシングルバンドは、レーン3のSDIA法によって分化誘導されたES細胞溶解液中では検出されたが、レーン2のネガティブコントロール(ラットの神経幹細胞)においては検出されなかった。レーン1のポジティブコントロール(ラット水晶体タンパク質)においては、2つのバンド(22kDaと25kDa)が検出された。25kDaのバンドは、ラットの $\alpha$ -クリスタリンで発現し得るAinsと思われる。

## 【0069】

図3(b)に示すPax6の発現に関して言えば、ウサギ抗Pax6抗体は、48kDaのPaxタンパク質を検出した。Pax6は合成したレントイド内(レーン3)においては発現するが、PA6フィーダー細胞(レーン1)や未分化のES細胞(レーン2)においては発現しないことが確認された。

## 【0070】

従来文献[Furuta Y., Hogan BL., BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo, Genes Dev, 1998年、12巻、3764-3775頁]に報告されているように、Pax6は水晶体の形成に必須である。眼胞と表皮外胚葉との相互作用におけるPax6の発現は、水晶板の形成と、嵌入を誘導する。水晶体の前駆体にPax6が欠如すると、水晶体の形成において欠陥が生じる。

## 【0071】

本実験において、ES細胞の分化からレントイドにおけるPax6の発現が導かれるということが確認された。Pax6は、ES細胞からのレントイドの形成と、通常の発達の両方の機能を担う重要な因子であることが示唆される。また、この結果から、SDIA法によるES細胞の分化誘導によって、水晶体が形成されたことが裏付けられた。

## 【0072】

## (3) レントイド誘導における外因性FGF-2の影響について

続いて、霊長類のES細胞からのレントイドを誘導する場合におけるFGF-2濃度の影響を評価した。その結果を図4に示す。図4は、未分化ES細胞を維持する際の培地中のFGF-2の濃度が、2、4、8 ng/mlの各場合における誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合(%)との関係を示すグラフである。なお、図4では、FGF-2の濃度が2 ng/mlの場合を◆で示し、4 ng/mlの場合を■で示し、8 ng/mlの場合を△で示している。

図4に示すように、誘導開始から20日間は、濃度の違いによる有意な差は見られなかった。誘導開始から30日以上経過後には、レントイドを含むコロニーのパーセンテージは、FGF-2濃度の増加に伴って用量依存的に増加した。本願発明者等はまた、FGF-2をES分化培地へ添加することを試みた。しかし

、PA6細胞の成長があまりにも早すぎるため、分化するES細胞を維持することはできなかった（データ示さず）。

#### 【0073】

FGFが水晶体の分化と発達において重要な役割を果たし得るということは、いくつかの研究で報告されている。例えば、哺乳類においては、線維芽細胞成長因子（FGF）は、水晶体線維の分化を促進する（参考文献〔Chamberlain CG., McAvoy JW., Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation, Curr Eye Res, 1987年、6巻、1165-1169頁〕）。FGF-1およびFGF-2は、発達段階においてマウスの神経網膜と水晶体細胞で発現し、FGFR（FGFレセプター）-1、および-2も水晶体細胞で発現する。

#### 【0074】

本実験では、未分化ES細胞維持培地におけるFGF-2濃度の増加が、レントイドの分化に影響を及ぼすことが示された。つまり、FGF-2の濃度を維持培地中に2 g/mlよりも多く含有させることで、その後のレントイドの分化誘導を促進させることができるということが確認された。この結果から、FGF-2は、SDIA培地での分化因子のレセプターを上方制御することによって、未分化ES細胞を分化因子に上手く応答させる可能性が示唆される。

#### 【0075】

（4）レントイド誘導におけるコロニー密度の影響について

次に、PA6フィーダー細胞にES細胞を植え付ける場合のES細胞の細胞密度とレントイド誘導との関係を調べた結果を図5に示す。図5は、ES細胞密度が高密度（200コロニー以上/10cmの培養皿：図5では■で示す）の場合、低密度（150コロニー以下/内径10cm培養皿：図5では◆で示す）の場合、それぞれの誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合（%）との関係を示すグラフである。

#### 【0076】

図5に示すように、レントイドを含むコロニーのパーセンテージは、培養段階の開始時に添加されたESコロニーの密度に比例して増加した。

#### 【0077】

また、図6には、誘導開始から30日経過後におけるFGF-2の濃度に応じたコロニー密度の影響を示す。図6のグラフでは、左から順にFGF-2の濃度が2 ng/mlの場合、4 ng/mlの場合、8 ng/mlの場合のレントイドの誘導割合(%)を示し、また、各濃度のFGF-2について、白色の棒グラフがコロニー密度の低いもの(150コロニー以下/内径10 cm培養皿)、黒色の棒グラフがコロニー密度の高いもの(200コロニー以上/10 cmの培養皿)を示している。

#### 【0078】

図6に示すように、誘導から30日後において、PA6細胞上に高密度(200コロニー以上/10 cmの培養皿)で植え付けられた培養液中のES細胞分化によって誘導されたレントイドの数は、低密度(150コロニー以下/10 cm培養皿)で植え付けられた場合のレントイドの数と比較して多かった。また、レントイド細胞の数は、誘導に先立って植え付けられたES細胞の密度の増加に伴って直線的に増加することがわかった。同様の結果が誘導開始から40日後に観察された。しかしながら、20日では有意な差は観察されなかった。

#### 【0079】

なお、図7(a)には、高コロニー密度で培養した場合のレントイドを、顕微鏡で観察した結果を示す。この図から、種々のレントイドがいくつかのコロニーによって形成されていることがわかる。右下のスケールバーは100  $\mu$ mである。図7(b)には、高コロニー密度で培養した場合の網膜の色素性上皮細胞を、顕微鏡で観察した結果を示す。この図から、矢印で示す網膜の色素性上皮細胞は、いくつかのコロニーによって形成されていることがわかる。右下のスケールバーは100  $\mu$ mである。このように、網膜の色素性上皮細胞の誘導についても、コロニー密度が高い培養液で増加した。

#### 【0080】

以上の結果から、植え付けられたコロニーの密度は、レントイド誘導の量に影響を及ぼす可能性を示唆する。細胞間接触は、マウスの水晶体上皮細胞によるレントイドの形成に重要である。また、鶏のヒナの神経網膜の水晶体への分化転換も、幾層にも関連して混み合った状況下で起きる。このように、レントイドの形

成は、混み合った状態で発生する傾向にあり、それゆえ、コロニー密度は重要な分化因子となり得る。コロニー密度は、網膜の色素性上皮細胞の分化量に影響を及ぼし得る。これらのデータは、コロニーが混み合った状態の場合に、その後に行われるSDIA処理によって、眼球細胞がより形成されやすくなるということを示唆する。

#### 【0081】

本実験結果をまとめると、ES細胞の維持過程において維持培地のFGF-2濃度を高くし、PA6上に植え付けられるES細胞のコロニー密度を高くして、SDIA法を実施することによって、カニクイザルのES細胞から安定してレントイドを再生することができることが確認された。

#### 【0082】

##### 【発明の効果】

以上のように、本発明の水晶体細胞の作製方法によれば、ES細胞から水晶体細胞を安定して作製することができ、移植用生体材料としての利用可能性を有する水晶体細胞およびその水晶体細胞からなる水晶体線維組織を得ることができる。上記の方法で作製された水晶体細胞は、ES細胞から均質な細胞群として再生されたものであるため、再生医療における移植用の生体材料の開発に有効利用することができる。

#### 【0083】

本発明は、ヒトを含む霊長類のES細胞から水晶体への分化誘導を成功させた初めての例であり、ES細胞の分化に関するメカニズムを解明に寄与するという学術的意義を有するだけでなく、白内障治療薬の研究開発に役立てることができるという医薬分野の発展に寄与する可能性も有している。それゆえ、本発明の有用性は高い。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

(a)～(d)は、本実施例において分化誘導されたレントイドを位相差顕微鏡によって観察した結果を示す図である。

##### 【図2】

本実施例において分化誘導されたレントイドを免疫染色した結果を示す図である。

【図 3】

本実施例で分化誘導された細胞について、タンパク質の発現を調査したウエスタンブロット解析の結果を示す図である。(a) はクリスタリンアルファ A の発現を、(b) は Pax 6 の発現を、それぞれ調査したものである。

【図 4】

未分化 ES 細胞を維持する際の培地中の FGF-2 の濃度が、2、4、8 ng/ml の各場合における誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示すグラフである。

【図 5】

ES 細胞密度が高密度の場合、低密度の場合それぞれの、誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示すグラフである。

【図 6】

ES 細胞密度が高密度の場合、低密度の場合それぞれの、誘導開始から 30 日経過後における FGF-2 の濃度に応じたレントイドの誘導割合 (%) 示すグラフである。

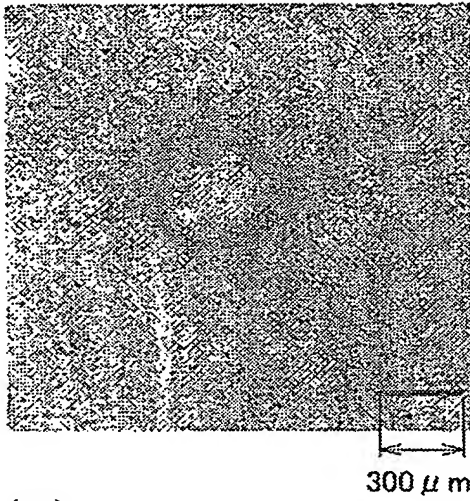
【図 7】

(a) は、高コロニー密度で培養した場合のレントイドを、顕微鏡で観察した結果を示す図である。(b) は、高コロニー密度で培養した場合の網膜の色素性上皮細胞を、顕微鏡で観察した結果を示す図である。

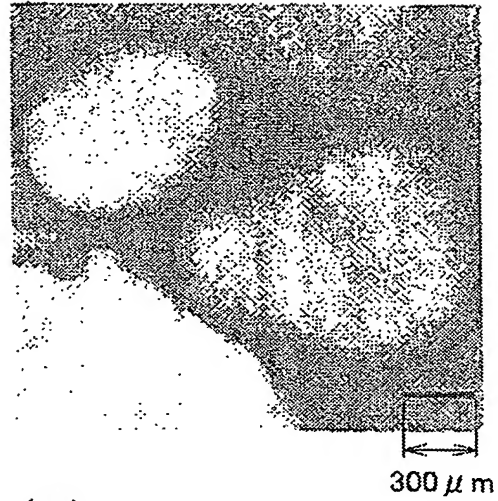
【書類名】 図面

【図 1】

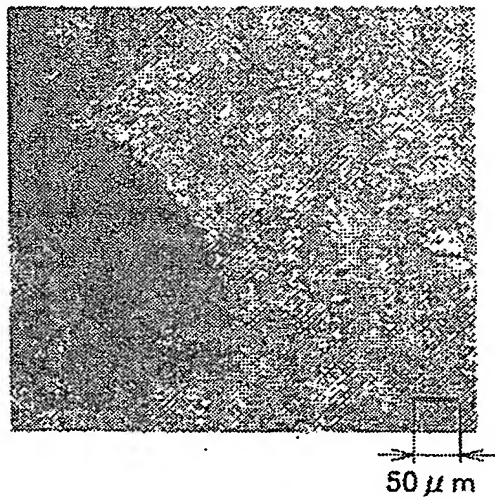
(a)



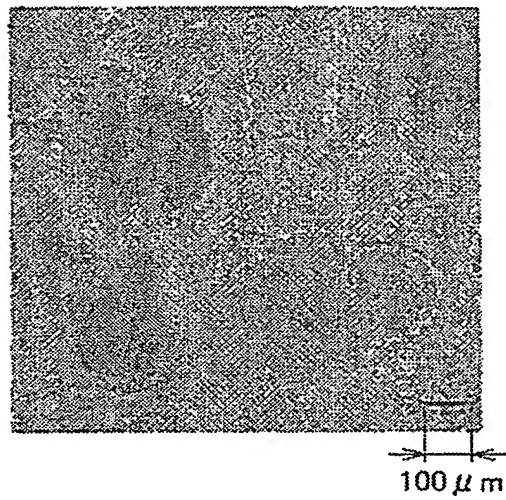
(b)



(c)

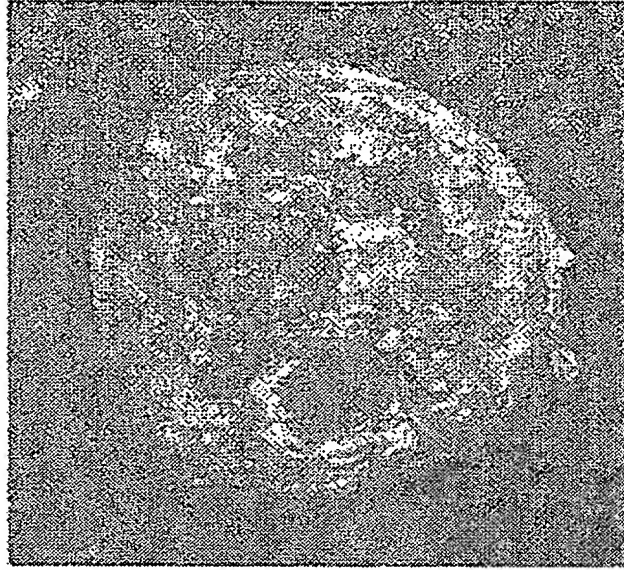


(d)



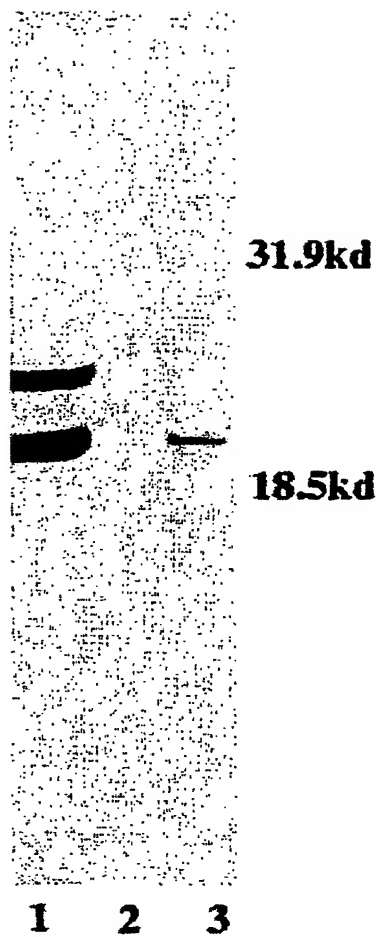


【図 2】



【図 3】

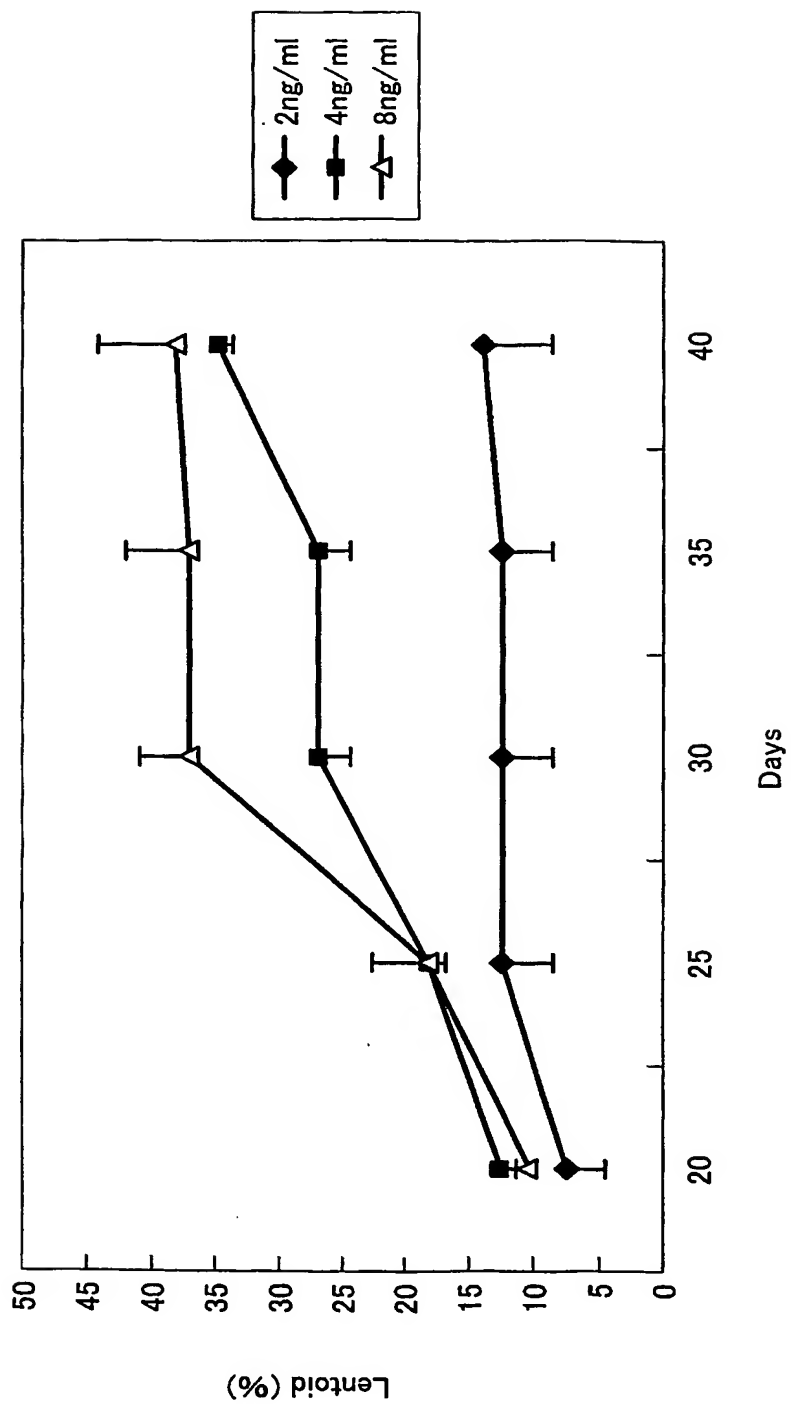
(a)



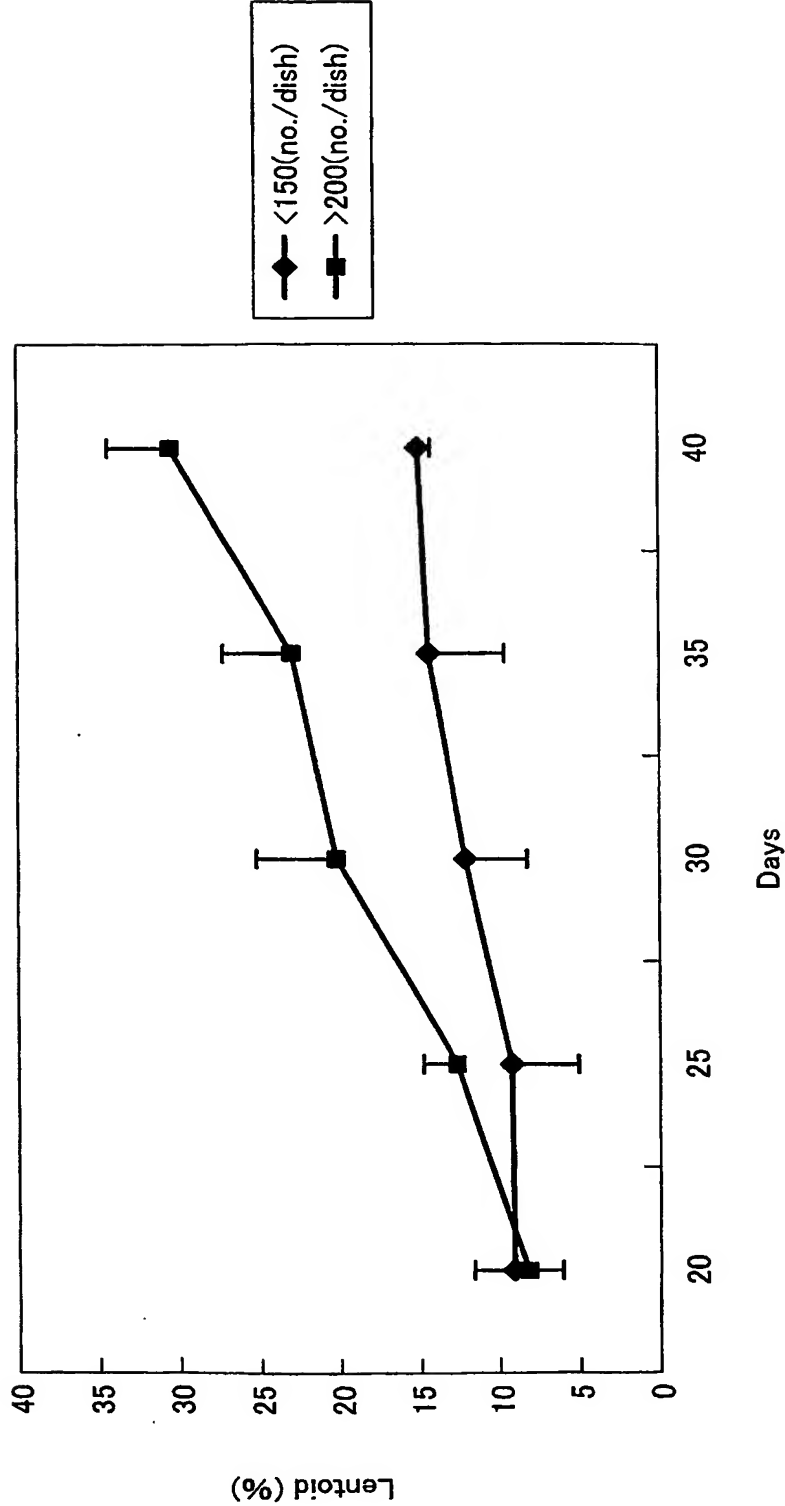
(b)



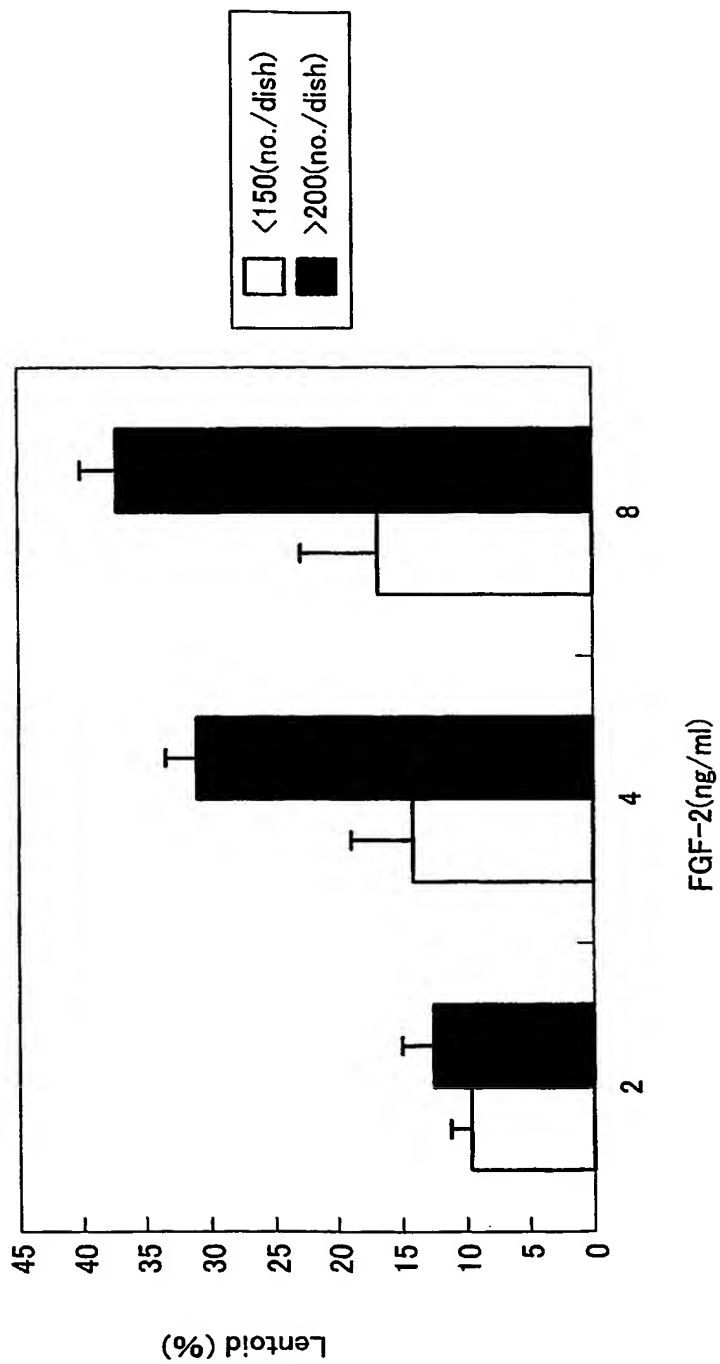
【図 4】



【図 5】

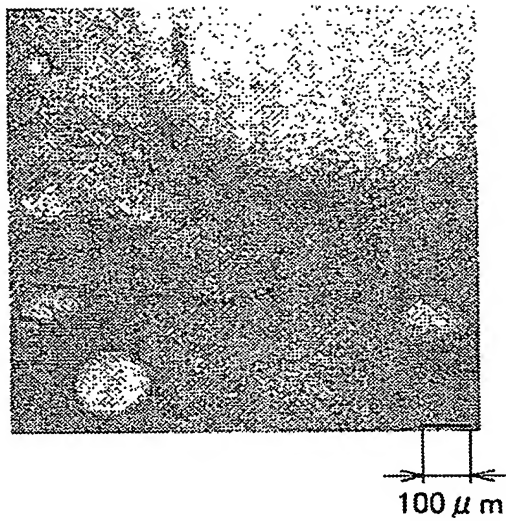


【図 6】

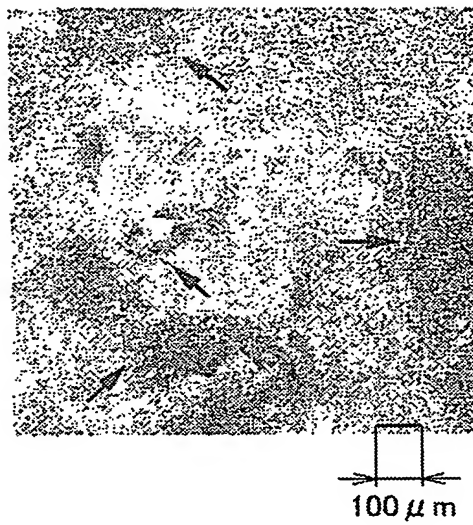


【図 7】

(a)



(b)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 霊長類のES細胞に分化を誘導することで水晶体細胞を安定して作製する方法、および、この方法によって作製される水晶体細胞を提供する。

【解決手段】 本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子FGF-2を2～50 ng/mlの濃度で含有する培地を用いてES細胞を維持するES細胞維持工程と、上記ES細胞維持工程の後に、上記ES細胞をマウス頭蓋骨髓細胞PA6上に2～6.5コロニー/cm<sup>2</sup>の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記ES細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなるものである。また、上記ES細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、ES分化培地を用いて未分化のES細胞を1回のみ洗浄する工程をさらに含むことが好ましい。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
【提出日】 平成15年10月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003- 96002  
【承継人】  
【識別番号】 503360115  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代表者】 沖村 憲樹  
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417  
【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。  
【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。



特願 2003-096002

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 0 9 6 0 0 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**